

⑫ 公表特許公報(A)

平5-506427

⑬ 公表 平成5年(1993)9月22日

⑭ Int. Cl.⁵
C 07 K 7/10
A 61 K 37/28
// C 07 K 99:00

識別記号
ZNA
ADP

庁内整理番号
8318-4H
8314-4C

審査請求 未請求
予備審査請求 有

部門(区分) 3(2)

(全 16 頁)

⑯ 発明の名称 糖尿病治療に有用な GLP-1 アナログ

⑰ 特 願 平3-503618

⑱ 出 願 平3(1991)1月24日

⑲ 翻訳文提出日 平4(1992)7月24日

⑳ 国際出願 PCT/US91/00500

㉑ 国際公開番号 WO91/11457

㉒ 国際公開日 平3(1991)8月8日

優先権主張 ㉓ 1990年1月24日 ㉔ 米国(US) ㉕ 468,736

⑳ 発 明 者 バックレイ, ダグラス アイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 94062 ウッドサイド, ブルツ
クウッド ロード 215

㉑ 出 願 人 バックレイ, ダグラス アイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア 94062 ウッドサイド, ブルツ
クウッド ロード 215

㉒ 代 理 人 弁理士 山本 秀策

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. II型糖尿病の治療薬として有用なペプチドであって、
該ペプチドが、島細胞からのインシュリンの放出を刺激する
のに、グルカゴンよりも強力であり、該ペプチドが、実質的
に、GLP-1(7-34)、GLP-1(7-35)、GLP-1(7-36)またはGLP-1(7-
37)あるいはそのC末端アミド形態からなり、以下よりなる
群から選択される少なくとも1つの改変を有する、ペプチド

(a) 25位および/または34位のリシンを、中性アミノ酸、
アルギニンまたはD形リシンに置換、および/または36位の
アルギニンを、中性アミノ酸、リシンまたはD形アルギニン
に置換;

(b) 31位のトリプトファンを、酸化耐性アミノ酸に置換

(c) 以下の少なくとも1つの置換:

16位のVをYに;

18位のSをIに;

21位のEをDに;

22位のGをSに;

23位のQをRに;

24位のAをRに; および

28位のIをQに;

(d) 以下の少なくとも1つを含む置換:

8位のAを、他の小中性アミノ酸に;

9位のIを、他の酸性アミノ酸または中性アミノ酸に

10位のGを、他の中性アミノ酸に; および

15位のDを、他の酸性アミノ酸に; ならびに

(e) 7位のヒスチジンを、他の中性アミノ酸、あるいはD
またはNアシル化またはアルキル化形のヒスチジンに置換、
ここで、(a)、(b)、(d)および(e)において、
置換するアミノ酸は、必要に応じて、D形であり得、そして
7位に置換するアミノ酸は、必要に応じて、Nアシル化または
Nアルキル化形であり得る。

2. 唯一の改変が、請求項1のパラグラフ(a)に記載さ
れるものであり、25位および/または34位のリシンを置換す
るアミノ酸が、I, G, S, A, L, F, Q, M, RおよびR'からな
る群から選択され、そして31位のアルギニンを置換するア
ミノ酸が、I, I', G, S, A, L, J, Q, RおよびR'からなる群か
ら選択され、

必要に応じて、請求項1のもう1つの別のパラグラフに記
載の改変と組合わされる、請求項1に記載のペプチド。

3. 唯一の改変が、請求項1のパラグラフ(b)に記載さ
れるものであり、そして31位のトリプトファンを置換するア
ミノ酸が、F, V, L, I, AおよびYからなる群から選択され、
必要に応じて、請求項1のもう1つの別のパラグラフに記
載の改変と組合わされる、請求項1に記載のペプチド。

4. 唯一の改変が、請求項1のパラグラフ(c)に記載さ

れるものであり、22位のQをSに置換すること、23位および24位のそれぞれQおよびIをRに置換すること、ならびに25位のIをQに置換することを組合せて行ったが、あるいは16位のVをYで置換すること、および18位のSをIで置換することを行ったが、あるいはこれらの置換と21位のBをDで置換することを行っており、

必要に応じて、請求項1のもう1つの別のパラグラフに記載の改変と組合わされる、請求項1に記載のペプチド。

5. 唯一の改変が、請求項1のパラグラフ(d)に記載されるものであり、8位のアラニンを置換する小さい中性アミノ酸が、S、ST、G、C、Ct、Sar、At、beta-alaおよびAlbからなる群から選択され、そして9位のグルタミン酸を置換する酸性または中性アミノ酸が、Et、D、Dt、Cys、T、Tt、K、Nt、Q、Qt、Cit、MSOおよびアセチル-Eからなる群から選択され、そして10位のグリシンを置換する代替の中性アミノ酸が、S、Sj、Y、Yt、T、Tt、N、Nt、Q、Qt、Cit、MSO、アセチル-E、PおよびPtからなる群から選択され、

必要に応じて、請求項1のもう1つの別のパラグラフに記載の改変と組合わされる、請求項1に記載のペプチド。

6. 唯一の改変が、請求項1のパラグラフ(e)に記載されるものであり、7位のヒスチジンを置換するアミノ酸が、Bt、Y、Yt、P、Pt、R、Rt、Orn、Ornt、M、Mt、N-ホルミル-B、N-ホルミル-Bt、N-アセチル-B、N-アセチル-Bt、N-イソプロビル-B、N-イソプロビル-Bt、N-アセチル-I、N-アセチル-It、

(b) 8位のアラニンを、D形アミノ酸に置換；および

(c) 7位のヒスチジンを、Nアシル化(1-8C)またはNアシル化(1-8C)形態の代替アミノ酸またはヒスチジンに置換。

9. 唯一の改変が、請求項8のパラグラフ(a)に記載されるものであり、7位のヒスチジンを置換するD形アミノ酸が、Pt、Dt、Et、K、Qt、Lt、Yt、ItおよびItからなる群から選択され、

必要に応じて、請求項8のもう1つの別のパラグラフに記載の改変と組合わされる、請求項8に記載のペプチド。

10. 唯一の改変が、請求項8のパラグラフ(b)に記載されるものであり、8位のD形アミノ酸が、Pt、Yt、Lt、ItおよびItからなる群から選択され、

必要に応じて、請求項8のもう1つの別のパラグラフに記載の改変と組合わされる、請求項8に記載のペプチド。

11. 唯一の改変が、請求項8のパラグラフ(c)に記載されるものであり、アルキル化またはアセチル化アミノ酸が、P、D、E、K、Q、Y、L、I、IおよびIからなる群から選択され、

必要に応じて、請求項8のもう1つの別のパラグラフに記載の改変と組合わされる、請求項8に記載のペプチド。

12. II型糖尿病の治療に有用な薬学組成物であって、薬学的に許容可能な無形剤と混合された形の、請求項1または8に記載の有効量のペプチドを含む、組成物。

13. II型糖尿病の治療方法であって、このような治療を必要とする被検体に、請求項1または8に記載のペプチドを

PおよびP*からなる群から選択され、

必要に応じて、請求項1のもう1つの別のパラグラフに記載の改変と組合わされる、請求項1に記載のペプチド。

7. 以下からなる群から選択される、請求項1に記載のペプチド：

(HT)⁷-GLP-1(7-37)

(Y)⁷-GLP-1(7-37)

(N-アセチル-B)⁷-GLP-1(7-37)

(N-イソプロビル-B)⁷-GLP-1(7-37)

(At)⁸-GLP-1(7-37)

(Et)⁹-GLP-1(7-37)

(D)⁹-GLP-1(7-37)

(Dt)⁹-GLP-1(7-37)

(Pt)¹⁰-GLP-1(7-37)

(S)²²(R)²³(S)²⁴(Q)²⁵-GLP-1(7-37)、および

(S)⁸(Q)⁹(Y)¹⁶(X)¹⁸(D)²¹-GLP-1(7-37)。

8. II型糖尿病の治療薬として有用なペプチドであって、該ペプチドが、GLP-1(7-37)と比較して、プラズマ中での分解耐性が向上しており、該ペプチドが、実質的に、GLP-1(7-34)、GLP-1(7-35)、GLP-1(7-36)またはGLP-1(7-37)、あるいはそのC末端アミド形からなり、以下からなる群から選択される少なくとも1つの改変を有する、ペプチド：

(a) 7位のヒスチジンを、D形中性または酸性アミノ酸、あるいはD形ヒスチジンに置換；

またはその薬学組成物を有効量投与することを包含する、方法。

14. 以下からなる群から選択される、請求項8に記載のペプチド：

(HT)⁷-GLP-1(7-37)、

(N-アセチル-B)⁷-GLP-1(7-37)、

(N-イソプロビル-B)⁷-GLP-1(7-37)、

(N-アセチル-I)⁷-GLP-1(7-37)、および

(At)⁸-GLP-1(7-37)。

糖尿病治療に有用なGLP-1アナログ

本出願は、1990年1月24日出願の米国特許出願第466,736号の一部継続出願である。

技術分野

本発明は、改良された薬学的組成物の分野に関する。詳細には、本発明は、薬理学的特性が向上した、7～38位または7～37位のグルカゴン様ペプチドIフラグメントのアナログに関する。

背景技術

グルコースの代謝は、インスリン、グルカゴン、およびガストリック・インヒビトリ・ペプチド(GIP)を含む多くのペプチドホルモンによって調節される。これらのペプチドホルモンがこの代謝を調節する複雑なメカニズム、および、これらが相互にどのように影響するかについては、少なくともその一部が解明されている。例えば、グルカゴンは、インスリンを産生する膵臓β細胞の表面のレセプターに結合し、インスリンの分泌を刺激する。グルカゴン様ペプチドIが、インスリンの分泌を刺激すると示唆されているが、これについては確認されていない。

これらのホルモンの内の数種類は、哺乳類のグルカゴン前

特表平5-506427(3)

駆体である「プログルカゴン」から生じる。「プログルカゴン」は、180個のアミノ酸のペプチドである。このペプチドのタンパク質分解およびプロセッシングにより、これらの多くのタンパク質ホルモンが得られる。プロセッシングの結果は、プロセッシングが行われる細胞の起源に左右される。例えば、ブタおよびラットの膵臓では、プログルカゴンはプロセッシングによってグルカゴンとグリセニン関連膵臓ペプチドとを形成する。グリセニン関連膵臓ペプチドは、GLP-1およびGLP-2配列の双方を含む大型のペプチドである。ブタの小腸では、分泌物は、59個のアミノ酸のグルカゴン含有ペプチドグリセニン、ならびに別のペプチドとしての2個のグルカゴン様配列、即ちGLP-1およびGLP-2である。

しかし、いずれにしても、プログルカゴンの全配列は、グルカゴンの29個のアミノ酸配列、GLP-1の36個または37個のアミノ酸配列、およびGLP-2の34個のアミノ酸配列を含んでいる。これらの配列間には、アミノ酸スペーサー配列が介在している。

GLP-1の活性パターンを解明する初期の試みでは、曖昧な見解が出されていたが、これに続いて得られた結論は、このペプチドの切断型が生物学的に活性であるということである。Mojsov, S.らのJ Clin Invest (1987) 79:616-619は、31個のアミノ酸ペプチドGLP-1(7-37)のみが膵臓からのインスリン放出を強く刺激することを開示している。これより以前に、切断型および完全長の37個のアミノ酸形態

の膵臓および腸での発見はされていた。おそらくはカルボキシル末端がアミド化されたGLP-1(7-36)もまた、インスリン放出の強力なメディエーターである。(例えばBolst, J.J.ら、PERS Letters (1987) 21:169-174を参照のこと)。

以下に記載する本発明は、これらのGLP-1の切断型のアナログに関する。これらのアナログは、グルコースにより誘導されるインスリン分泌、およびグルコースにより誘導されるグルカゴン分泌阻害を促進する際の有効性、並びに循環半減期に関連しており、所望の組み合わせの特徴を備えている。グルコースにより誘導されるインスリン分泌を促進する際の切断型の生理学的効果は、Bolst, J.J.らおよびMojsov, S.ら(前出)によって上記のように提示されている。グルカゴン放出阻害における切断型ホルモンの活性については、Orskov, C.らのEndocrinol (1988) 123:2009-2013およびSuzuki, S.らのDiabetes Research: Clinical Practice (1988) 1(付録1):530に提示されている。これらの切断型の循環半減期は短く、KreymanらのThe Lancet (1987年12月5日) 1300-1303に示されているように、約4分である。これらの切断型GLP-1ペプチドの改変型によって、これらの特性が最適となる可能性が得られる。

膵臓および血液中のペプチドホルモンの分解ならびに一般的なインビボでのこのようなホルモンの半減期の研究に関して幾つかの文献がある。Macdonald, J.I.らによる初期の文献J Biol Chem (1989) 264:8199-8208では、ジペプチダーゼが

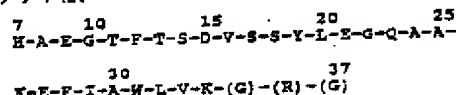
ラット肝臓中のグルカゴンの分解の原因であることが明らかにされた。成長ホルモン放出因子、即ち一般的なグルカゴンのGLP-1およびGLP-2ファミリーのメンバーの研究により、このメンバーが、インビボで血液中において急速に分解されること、およびインビボでジペプチダーゼによっても急速に分解されることが明らかにされた(Frohman, L.A.ら、J Clin Invest (1986) 78:906-913)。Murphy, W.A.らは、Epitide Research (1988) 1:36-41において、全てではないが幾つかのアルキル化された成長ホルモン放出因子ペプチドがインビボでさらに高い有効性を示すことを明らかにした。特に、例えば、トリイソプロピル化されたGRF-29は、GRF-29自体より106倍高い活性を示すことが発見された。一方、N末端がメチル化されたGRF-29ではその有効性は元の僅か40%であった。このホルモンの2位のD-Alaの置換によってその有効性が向上することもまた明らかにされた。特性へのどのような効果によって有効性の向上が得られるのかは、当然明らかではなかった。

他に、GLP-1(7-37)の幾つかの改変が試みられている。7位のヒスチジン残基を欠失させるとこのホルモンの活性が大幅に低減されることが明らかにされている(Suzuki, S.ら(前出); Hendrick, G.R.ら、Abstract:Endocrine Society Meeting, New Orleans, LA (1988))。1個またはそれ以上のC末端欠失の効果については対立する報告がなされている(Suzuki, S.ら(前出); Yanaihara, C.ら、Abstract for

A Glucagon and Related Peptides Satellite Symposium, 8th International Congress of Endocrinology, 1988年7月15~18日, Osaka, Japan)。しかし、このペプチドホルモンファミリーの他のメンバー、例えば、GIP、グルカゴン放出因子(GRF)、セクレチン、およびパソアクティブ・インテスティナル・ポリペプチド(VIP)の改変に関する文献は多い。

発明の開示

本発明は、GLP-1 (7-34); (7-35); (7-36) もしくは (7-37) ヒトペプチドの改変型またはこれらのC末端がアミド化された形態の改変型を提供する。天然ペプチドは、



のアミノ酸配列を有しており、この配列中の(G)、(R)および(G)が存在するかどうかは、指示された鎖長による。

改変型では、天然の構造に1箇所またはそれ以上の改変が加えられており、治療に有用な能力が向上している。これらの改変型では、グルカゴンよりもインスリン分泌を促進するための有効性が高いか、もしくは血漿中での安定性が向上しているか、またはその両方である。この有効性および向上した安定性は、以下に記載するように分析され得る。

アミノ酸には標準一文字略記コードを使用する。

DあるいはNアシル化またはDあるいはNアルキル化型のヒスチジンに置換。

(a)、(b)、(d) および (e) の改変に関しては、置換するアミノ酸は、D型であり得る。これは、例えばC⁺などのように上付き文字*で示される。7位において置換するアミノ酸はNアシル化またはNアルキル化型でもあり得る。

したがって、本発明は、そのひとつの局面において、上記のように、向上したインスリン刺激特性を有し、上述のGLP-1 (7-34) からGLP-1 (7-37) までの切断型と相同性のあるペプチドに関する。

他の局面においては、本発明は、GLP-1 (7-37) と比較して、血漿中での耐分解性が向上したペプチドに関する。この向上した耐分解性は、以下に記載のように定義される。これらのアナログでは、上記の切断型のGLP-1 (7-34) からGLP-1 (7-37) またはこれらのC末端アミド化型の内の何れかが、以下のように改変される。

(a) 7位のHをD中性もしくはD酸性アミノ酸に置換、または

(b) 8位のAをDアミノ酸に置換、または

(c) 上記の双方の置換、または

(d) 7位のHを任意の自然のアミノ酸のNアシル化型もしくはNアルキル化型に置換。

したがって、耐分解性を有する本発明のアナログとしては、(N-アシル(1-6C)AA)*GLP-1 (7-37) およ

ブインスリン刺激特性の向上を呈する本発明のアナログは、前記の配列またはそのC末端アミド化物に、以下からなる群から選択される少なくともひとつの改変を加えた配列を有する：

(a) 26位および/もしくは34位のリシンを、中性アミノ酸、アルギニンもしくはD型のリシンに、ならびに/または36位のアルギニンを中性アミノ酸、リシンもしくはD型のアルギニンに置換；

(b) 31位のトリプトファンを耐酸化性アミノ酸に置換

(c) 以下の内の少なくともひとつの置換：

16位のVをYに；

18位のSをKに；

21位のEをDに；

22位のGをSに；

23位のQをRに；

24位のAをRに；および

26位のKをQに；

(d) 以下の内の少なくともひとつの置換：

8位のAを他の小型中性アミノ酸に；

9位のEを他の酸性アミノ酸または中性アミノ酸に；

10位のGを他の中性アミノ酸に；および

15位のDを他の酸性アミノ酸に；ならびに

(e) 7位のヒスチジンを、他の中性アミノ酸、あるいは

び(N-アルキル(1-6C)AA)*GLP-1 (7-37) がある。ここでAAは、リシル残基であり、1つまたは両方の置換がアルキル化またはアシル化される。AAは、インスリン刺激活性の保持に対応する任意のアミノ酸を示す。

7位および8位のD型アミノ酸の置換には、任意の酸性または中性アミノ酸のD残基を7位に、そして、任意のアミノ酸のD残基を8位に使用し得る。これらもまた、インスリン刺激活性に対応するものである。7位および8位の何れか一方または両方をDアミノ酸に置換することができる；7位のDアミノ酸を上記のようにアシル化またはアルキル化することもできる。これらの改変型は、上記のように、GLP-1 (7-37) だけではなく、さらに短い切断型のアナログにも適用可能である。

他の局面では、本発明は、1種類またはそれ以上のこれらのペプチドを活性成分として含む薬学的組成物、およびこれらのペプチドまたはその組成物を用いて1型糖尿病を治療する方法に関する。

図面の簡単な説明

図1は、本明細書で使用するアミノ酸の分類の概略を模式的に示したものである。

図2は、本発明の種々の化合物を表に示したものである。

図3は、血漿中の2種類のアナログの血漿中での分解を調べるためのラジオラベルシーケンシング分析の結果を示す。

図4は、アミノ末端領域に改変を加えたGLP-1 (7-3

7) のアナログによる、アミノ末端特異的抗血清からの¹²⁵I-G L P-1 (7-39) の置換の結果を示す。

発明を実施するための形態

本発明のアナログは、G L P-1 (7-34)、(7-35)、(7-36) または (7-37) の改変型であって、その特徴は、培養物中の単離されたラット島細胞からのインスリン放出を測定するインビトロでのアッセイでグルカゴンよりも高い有効性を示すこと、もしくは、血漿中での安定性の向上を示すこと、またはこれらの両方である。

向上したインスリン放出刺激特性を有するアナログのアッセイ

本発明のアナログのひとつのグループは、島細胞からのインスリン放出を刺激するに際してグルカゴンよりも強力である。「島細胞からのインスリン放出を刺激するのにグルカゴンよりも強力」であるとは、言及するアナログが、以下の記述から選択されるインビトロでのアッセイにおいて、より高い有効性を示すことを意味する。これらのアッセイのためのラット島は、本明細書に援用される Setton, R. らの Transplantation (1986) 42:585-591 に記載の方法によって単離される。簡単に記載すれば、SD 雄ラットに麻酔をかけて、その総胆管の下端に、適切な位置に固定した 2 F G カニューレを導入する。次に、胆管の胆管ツリー (biliary tree) への入口領域の上方で左右の肝管を各々別個に結紮する。ラットを放血により殺して、7.5mM の C a C l₂、20mM の H E P E S 緩衝液および 1~5μg/mL の I 型コラゲナーゼを含有する 3mL のハ

ンクス液を、カニューレ中に流入させて、肝臓を均一に影響させる。次いで、肝臓を摘出し、氷上のピーカーに入れた後に、20mM の H E P E S 緩衝液を含有するハンクス液中で 37℃ にてインキュベーションを行う。

インキュベーションを 13~25 分間行った後に、肝臓を取り出し、5g/L のラシ血清アルブミンおよび 20mM の H E P E S 緩衝液を含有する 4℃ のハンクス液の中に入れる。

そして、全ての肝臓組織を 14 F G 針を用いて静かにシリンジにとり、さらに、H E P E S を上記のように含有するハンクス液中に懸濁させて、10 秒間 50g で遠心分離した後に、上澄みを廃棄する。この組織ペレットを再度懸濁させて、再度静かに、シリンジにとり、その後さらに洗浄を行う。その後、分散した組織を孔サイズ 300μ のナイロンメッシュフィルターを通過させる。通過した組織を 350g で 5 秒間遠心分離し、上澄みを廃棄した後に、この組織を、H E P E S を上記のように含有するハンクス液に溶解して得た 15% のフィコール中に懸濁させる。このフィコール溶液には、23%、20% および 11% の不連続密度勾配の層が形成される。この密度勾配層を 4℃ にて 16 分間 750g で回転させる。そして、上の 2 つの界面から得られる組織をハンクス液中で 3 回洗浄した後に、切開用の顕微鏡で見て、島を手操作で採取する。

ひとつの方法では、次に、これらの島からの分泌を促進する G L P-1 アナログの能力を、本明細書に援用される、Sch

atz, H. らの "Methods in Diabetes Research" (1984) の Vol. 1, Part C: 291~307 ページに記載の方法によって決定する。この方法では、1 本の試験管当たり 5 個~10 個の島を 1mL のクレブス-リンガー-バイカーボネート緩衝液 (K R B 緩衝液) 中でインキュベートする。試験を行うために、グルカゴンまたは本発明の改変型アナログを 5~10μg/mL の割合で加える。放出されたインスリンのレベルは、本明細書に援用される Jensen, S. L. らの N. J. Physiol. (1978) 235:E581-E586 に記載の方法で測定され得る。

以下のプロトコールは、インスリン分泌刺激を測定するのに好ましい方法である。コラゲナーゼ消化の後に、島を、D M E M (ダルベッコの改良イーグル培地、16μg/mL グルコース)、2.8mM グルコースおよび 10% のラシ胎児血清 (F B S) 中で、5% の C O₂ 存在下で、37℃ にて一晩インキュベートすることにより、回収した。

翌日、実験に使用する島を、グルコースを含まず、0.2% の B S A (Armour, 臨床グレード、5% ストックで作製) を含有する D M E M に移し、血清およびグルコースを含まない培地で 60 分間プレインキュベートした。エッペンドルフピペットを用いて小島を採取し、8.0μL の培地を含有する 80μg の T C プレートに移して、インキュベーターに戻して 60 分間インキュベートする。この島を移す際に、その数を数える。(注: 各データ点は、5 個の島によるものであり、通常 4 回の実験を行う。したがって、各データ点に対して 20 個の島を使用

する。) 典型的には、各肝臓に対して 150~200 個の小島を回収する。疑わしい島 (崩れすぎているかまたは崩壊したもの) は使用されない。

この 60 分のプレインキュベーションの間に、実験準備を行うため、プレインキュベーション終了時には、島を 5 個ずつのグループにして実験条件下に移すだけでよい。実験の準備は、48 個のウェルを有する T C プレートにおいて各ウェルにつき 0.5mL の培地を用いて行う。0.2% の B S A を含有する D M E M に、グルコースを所望の濃度になるように (通常低血糖条件で 2.8mM、中血糖で 5.5mM のグルコース、または高血糖で 16.7mM のグルコース) 加え、さらに、試験化合物を種々の用量範囲 (典型的には 1pM~100nM) で加える。試験化合物を、-80℃ で保存されたストックから、0.2% の B S A を含有する磷酸緩衝液 (P B S) で 0.5mM まで系列希釈する。これは、管の側面上における損失を防止するためである。培地と試験化合物とを混合した後に、各 4 回の実験によるデータ点を得るための 4 個のウェルの各々に 0.5mL を加える。

プレインキュベーション期間終了後、各ウェルに 5 個の島を加える。島を容量 15μL のエッペンドルフピペットを用いて採取する。インキュベーションをさらに 60 分間継続し、その時点で、島を取り出さないように注意深く各ウェルから 0.5mL を採取する。そして、ウェルを再度調べて、島の数を確認する。次に、インスリン含有量を調べるためにインスリン R I A を用いて培地をアッセイする。培地を直ちにアッセイしな

い場合には、アッセイ時まで -20°C で保存される。インスリン分泌に対する用量応答曲線を作成して、これらの曲線からED₅₀を計算する。

グルカゴンより高い有効性の定義は、同じ濃度のグルカゴンとアナログとを用いた場合にアナログからのインスリン放出レベルの方が高いこと、あるいは、グルカゴンよりも低濃度のアナログを用いた場合に同じインスリン放出レベルが得られることであるとされる。

上記のアッセイは、向上した有効性の判断のために特異的な基準を提供するが、上記のものに代わる他のアッセイを使用することもできる。

本発明の化合物の有効性を調べる追加の試験では、RIN 1048-38細胞中のcAMP産生を刺激するこれらの化合物の能力を測定する。このアッセイは、以下に行われ得る。

第1日目に、 5×10^5 のRIN 1048-38細胞(Drucker, D. J.ら、Proc Natl Acad Sci USA (1987) 84:3434-3438)を、2.5mLのM1999培養液を入れた6個のウェル付きのディッシュの各ウェルに植えて付ける。第4日目に、細胞に新しい培養液を与えて、第8日に、アッセイを行う。

この時、各ウェルには $\sim 2.0 \sim 2.5 \times 10^5$ 個の細胞が存在する。アッセイは、増代が24回以下の細胞でのみ行われる。

開始00分前に、単分子層を2.5mLのPBSで2回洗浄し、培養液を、4.5g/Lのグルコースおよび0.1%のBSAを加えたDMEM培養液(アッセイ培養液)1.0mLに変える。開始0時の時点

で、培養液を吸引して、試験化合物を含有する1.0mLの新しいアッセイ培養液を加える。試験化合物は、0.1%のBSAを加えた50μLのPBS中に加えられ、コントロールは賦形剤のみに加えられる。インキュベーションを0~60分間継続する。

終了時に、馴化培養液および単分子層を採取して、細胞内および細胞外のcAMP含有量を測定する。細胞外測定では、培養液を取り出して遠心分離し、細胞残留物を全て除去する。細胞内測定では、培養液を取り出した後に、1.0mLの水冷95%エタノールを単分子層に加える。細胞をかき取って回収し、液体N₂を用いて2回の急速凍結/解凍サイクルにより溶解させる。次いで遠心分離によって細胞残留物を除去する。馴化培養液の等分置部分(ウェルの内容量の1/40)およびエタノールによる細胞抽出物について、RIAキットを用いてアセチル化プロトコールにより2回測定を行い、cAMPレベルを調べる。

上記と同様に、グルカゴンより高い有効性の定義は、同じ濃度のアナログおよびグルカゴンを用いた場合に高いcAMP刺激が得られること、または、アナログの濃度をより低くした場合に同じcAMP刺激が得られることとされる。

インスリン放出を媒介する向上した有効性を測定するための他のアッセイが、使用され得る。

インスリン放出を促進する化合物の能力は、インビトロおよびインビボの両方で試験され得る。放出されたインスリンを標準抗体アッセイを用いて検出できる。このアッセイは、

インビボでの研究で血漿を分析すること、および、インビトロで培養液または濾液を分析することによって行う。

例えば、有用なインビトロでのアッセイに、Penhos, J.C.らのDiabetes (1989) 38:733-738に記載の膵臓浸透アッセイ法(pancreatic infusion assay method)が使用される。これは、Feir, G.C.らのJ Clin Invest (1974) 54:1403-1412に記載の方法で使用されているように行われる。インスリン分泌は、Holst, J.J.らのPEBS Letters (1987) 211:189-194(前出)に記載の方法によっても測定され得る。インスリン刺激効果を調べるアッセイとして有用なものとして、RIN 1048-38細胞系中のアデニル酸シクラーゼ刺激の測定がある。Drucker, D.J.らのProc Natl Acad Sci USA (1987) 84:3434-3438(前出)。

グルカゴン放出の阻害は、Orstov, C.らのEndocrinol (1988) 123:2009-2013; Suzuki, S.らのDiabetes Research: Clin Lab Practice (1988) 2(付録1):S30(双方とも前出)に記載のように、明らかにされ得る。

分解に対する向上した安定性を調べるアッセイ

本発明のGLP-1アナログの治療効率は、アナログのインビボでの半減期を増加させることによって向上させ得る。「増加したインビボでの半減期」とは、以下に記載のものからなる群から選択されるアッセイに従って血漿存在下での分解に耐えると実証された能力を意味する。全てのアッセイにおいて、血液をヘパリン処理した管に集めて、これらの管を

氷上に静置し、約3,000rpmで10分間、卓上遠心分離機で遠心分離することによって、血漿を調製する。単離した血漿を4℃で保存する。

A. ラジオラベルシーケンシング:

GLPアナログを、標準ラジオラベリング法を用いて、19位における放射性ヨウ素化によって標識する。RIA緩衝液(50mM、pH7.4のNa₂HPO₄、0.25%のBSA(ArmourインスリンおよびFFAを含まない)、0.5%のBME、0.002%のポリリシン(Sigma 15,000mw)、0.05%のTween20、および0.1%のNaNa)に移した後に、放射性ヨウ素化ペプチド(約10⁵cpm/50μL)およびコールド(放射性物質を含まない)非ヨウ素化ペプチド(20μL 100nM)を、2mLの血漿に加えて、最終的に濃度を1nMとして、循環水浴中で所定の時間インキュベートする。血漿に加えたRIAバッファの総量は、必ず総体積の5%以下である。インキュベーション終了時に、水中の10%のバレットラシン(v/v)を最終濃度が0.1%になるように加えて反応を停止させる。

次に、C18 Sep-Pakを用いてこの血漿を抽出して、血漿タンパク質のバルクからアナログと全てのフラグメントを分離する。Sep-Pakカートリッジ(Waters)を、2mLの1-プロパノールで洗浄し、次いで2mLの水で洗浄して、その後に、2mLの0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を含有する20%のCH₃CN(緩衝液A)で平衡化する。

バレットラシンで処理された血漿を、0.1%のTFAを含有す

る CH_3CN を用いて20%の CH_3CN で得る。そして、これを1mLのプラスチック注射器を介してカートリッジを通して種やかに通過させる。次に、カートリッジを、1mLの緩衝液Aを各々洗浄液として用いて2回洗浄し、そして、2mLの、0.1% TFAを含有する50% CH_3CN (緩衝液B) を洗浄液として用いて溶出し、これを、シリコーン処理をした 12×75 のガラス管に流入させる。アナログまたはフラグメントの回収率は、90%を超える。

溶出液を、Speed vac中で100 μ Lまで濃縮して、もとの量の1mLのR I A緩衝液の洗浄液を加えた1.5mLのエッペンドルフ管に移す。

GLP-1 (7-37) のアナログを使用する場合に任意のアナログまたはそのフラグメントを精製するために、GLP-1、GLP-1 (7-37) を認識するがGLP-1 (7-36) を認識しない、24~37位の残基に対応する合成ペプチドに対して調製された、5 μ Lの抗血清で濃縮物を、処理する。より短い型のアナログを使用する場合には、他のカルボキシ末端特異的抗血清 (同様にして調製されるが、免疫原として24~34位、24~35位または24~36位の残基に対応するペプチドが用いられる) を使用する。これに、PBS中に10%(w/v)のタンパク質A-セファロース(Pharmacia)を溶解した100 μ Lの濾液を加え、この混合物を静かに揺り動かしつつ4℃にて一晩かけてインキュベートした。次いで、セファロースを、エッペンドルフ遠心分離機中で5秒間4℃にて

回転させて、ペレット状にして、その後このペレットを、冷R I A緩衝液を用いて2回、冷PBSを用いて4回洗浄する。

ニュージーランドホワイトラビットの体内で、GLP-1 (7-37) の24~37位の残基に対応する合成ペプチドフラグメントに対するポリクローナル抗体を誘起させた。この誘起には、Mosjor, Sらの J Biol Chem (1988) **263**:11880-11881に記載の方法を用いた。初期免疫感作を、鼠疫那リンパ節中に行い、完全フロイントアジュバントを使用した。初期免疫感作の後に、1週間毎に皮下追加免疫注射(boosts)を2回行い、不完全フロイントアジュバントを使用した。1回の免疫感作または追加免疫注射のために、100 μ gのペプチドおよび100 μ gのメチル化されたBSAを0.5mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中に溶解し、これを0.5mLのアジュバントで乳化させた。初期免疫感作から5週間後に、採血(50mL)を開始し、その後、1ヶ月ごとに行った。力価が前回の採血時と比べて顕著に低下した場合には、追加免疫注射を再度上記のように行った。

血液を4℃で一晩かけて凝結させることによって、血清を調製した。血餅を、2000gで15分間遠心分離することによってペレット状にして、血清を取り出した。血清を、各々同じ量になるように分割し、-20℃または-80℃で保存する。

次に、各100 μ Lの緩衝液Bの洗浄液を用いて、抗体タンパク質-Aセファロース複合体からのペプチドの溶出を3回行う。

次に、全体で300 μ Lとなった洗浄液をABI型477Aシーケンサーに直接かける。シーケンサーは、製造者の指示書に従って使用される。その後、各サイクルで得られる画分を取って、カウントを行う。カウントは、4mLのシンチレーション水溶液(ACS, Amersham)中で行われ得る。

標識が出現するサイクルは、N末端からの分解の程度を示す。GLP-1 (7-37) アナログにおいてN末端からの分解が生じない場合には、19位のチロシンに対応する13番目のサイクルで全ての標識が出現する。分解が生じると、標識はこれより前のサイクルに出現する。

B. RP-HPLCによるアッセイ

上記の方法は、血漿中でより長い半減期を示すための明らかな基準となるが、この特性を調べるための他のアッセイ形態を使用することもできる。ある好適なアッセイでは、逆相-HPLCを使用してアナログを分析することによってフラグメントへの分解を調べることができる。なぜならば、フラグメントがアナログ自体とは異なる保持時間を有するからである。このアッセイでは、アナログを血漿中に加え、これを放置する時間を様々に変えて、ラジオラベルシーケンシング分析に使用される上記の方法と類似の態様でアナログを回収する。具体的には、R I A緩衝液中の100nMの濃度のアナログを1mLの血漿中に入れて、最終的な濃度を1nMとし、これを37℃の循環水浴中で設定時間を様々に変えてインキュベートする。その後、血漿をバントラシン中で濃度0.1%(w/v)にす

ることによって、反応を停止させる。

次いで、ペプチドを上記のようにSep-Pak抽出によって精製する。溶出液をSpeed-vac上で約1mLまで濃縮し、1mLの蒸留水で希釈し、80℃で凍結させて、一晩凍結乾燥させる。この粉末を、1mLの出発血漿当たり0.5mLの緩衝液C (0.1%のTFA水溶液) 中で、再度懸濁させた後に、0.25mLをHewlett-Packard 1090L液体クロマトグラフ上に注入する。液体クロマトグラフには、Brownleeの2cmのC18ガードカラムと共にAlltech C18カラム (0.46 x 25 cm; 粒径10 μ m) を使用する。実験中ずっとOD₂₁₄において抽出をモニターする。溶媒の流速は1mL/分であった。緩衝液Cと緩衝液D (アセトニトリル中の0.1%のTFA) との間の勾配を40分間の実験時間に渡って設定する。勾配は、開始時に35%Dとし、注入後2分間はこれを維持し、その後の24分間で45%Dまで増加させる。勾配を、次の2分間で60%Dまで増加させて、2分間このレベルを維持し、その次の2分間で35%Dに戻す。実験の残りの8分間は35%Dに維持する。各実験の最初の30分間に、画分を0.5分毎に回収して、Speed-vac中で乾燥する。試料を、R I A (C末端特異的抗血清に対する結合のための、標識されたGLP-1 (7-37位) との結合を測定する) によって、または、従来のもしくは好適な他の何れかの方法で分析して、アナログまたはフラグメントの存在を調べることができる。

GLP-1 (7-37) のアミノ末端もしくはカルボキシル末端を調べるためのラジオイムノアッセイでは、シングルの

抗体置換フォーマットを使用する。抗体への ^{125}I -GLP-1 (7-37) の結合が、溶液中の非標識ペプチドの濃度を増加させることによって、徐々に置換される。抗体と結合したヨウ素化ペプチドを、溶液中の遊離ヨウ素化ペプチドから分離する。この分離は、PansorbinTM (Boehringer Mannheim) を用いて抗体-ペプチド複合体を沈降させることによって行われる。次いで、得られたペレットを、 γ カウンタによってカウントする。

C. N末端特異的抗体との結合の消失:

血漿中での半減期を評価する第3の方法では、ポリクローナルもしくはモノクローナル抗体が用いられる。これらの抗体は、N末端に対して特異的に調製され、分解したアナログには結合しない。これらの抗血清は、GLP-1 (7-22) に対応する合成ペプチドに対して調製された。このGLP-1 (7-22) は、カルボキシル末端に付加的なシステイン残基を含有し、しかも、このシステインを介してKLHに特異的に結合する。この結合は、Aldwin, L. の *Analytical Biochem* (1987) 164:494-501に記載されているように、sal-ssc-SSAを用いて行われる。ポリクローナル抗体は、ニュージランドキョウライビットの体内で生成された。この生成のために、完全フロイントアジュバントで乳化させた500 μg の複合体を用いて一次免疫感作を鼠疫部リンパ節中に行い、その後、2週間毎に不完全フロイントアジュバント中の各200 μg の追加免疫注射を2回行った。その後、1ヶ月毎に採血

(50 μL)を行い、力価が低い場合には、追加免疫注射を行う。モノクローナル抗体の生成では、Balb/cマウスに、0.5 μL の完全フロイントアジュバント中の200 μg の複合体を腹膜を介して注入して免疫処置した。0.5 μL の不完全フロイントアジュバント中の100 μg の複合体を隔週でマウスに追加免疫注射した。これらのマウスの脾臓から単離した細胞をFox-NY細胞と融合させて、モノクローナル細胞系を産生した。モノクローナル分泌細胞系は、標準ケーラー-ミルシュタイン技術を用いて産生される。モノクローナル上澄みおよびポリクローナル血清を、ELISA法を用いてふるい分けすることによって、GLP-1 (7-37) と結合しているがGLP-1 (8-37) と結合していないものを得る。この特異性は、標準溶液R I Aによって確認される。

GLP-1 (7-37) の分解速度の評価を、R I A緩衝液中のヒト血漿にこのアナログを加えることによって行う。一般に、100倍に濃縮された10 μL のペプチドを1 μL の血漿に加えて所望の濃度とする。次いで、この試料を37 $^{\circ}\text{C}$ の湯浴中でインキュベートし、様々な時点で各10 μL の試料部分を3回ずつ取り出す。これらの試料部分を、直ちにエクソノールを用いて沈降させて、ラジオイムノアッセイを行う。ラジオイムノアッセイでは、N末端特異的抗体の、放射性ヨウ素化されたGLP-1 (7-37) との結合のための競合を用いる。放射性ヨウ素化されたGLP-1 (7-37) ペプチドと競合する能力の消失は、アナログの分解を示す。

これらの何れのアッセイにおいても、試験されるアナログの分解速度がGLP-1 (7-37) に比べて小さい場合には、そのアナログは向上した安定性を有している。

アナログ

本発明のアナログは、グルカゴンに比べて高い有効性を有するか、あるいは向上した耐分解性を有しており、GLP-1 (7-34) からGLP-1 (7-37) の改変型である。これらのアナログのいくつかの例では、あるクラスのアミノ酸が天然の残基の代わりに置換される。

アミノ酸残基は、以下のように、および図1に示すように、一般的に4つの主要なサブクラスに分類される。

酸性: この残基は生理学的pHにおいてHイオンが消失しているために負の電荷を有する。この残基を含むペプチドが生理学的pHで水性溶液中に存在している時には、この残基はペプチドのコンフォメーション中の表面位置を求めて水溶液側に引き付けられる。

塩基性: この残基は生理学的pHにおいてHイオンと結合しているために正の電荷を有する。この残基を含むペプチドが生理学的pHで水性溶液中に存在している時には、この残基はペプチドのコンフォメーション中の表面位置を求めて水溶液側に引き付けられる。

中性/非極性: これらの残基は生理学的pHにおいて帯電していない。この残基を含むペプチドが水性溶液中に存在している時には、この残基はペプチドのコンフォメーション中の

内側の位置を求めて水溶液と反応する。これらの残基は、本明細書中では「疎水性」とも称する。

中性/極性: これらの残基は生理学的pHにおいて帯電していない。しかし、この残基を含むペプチドが水性溶液中に存在している時には、この残基はペプチドのコンフォメーション中の外側の位置を求めて水溶液側に引き付けられる。

個々の残基分子の統計的な集合の中には、帯電しているものも帯電していないものもあり、水性溶液に引き付けられるかまたはこれと反応する程度が大きい場合あるいは小さい場合があることは、当然理解されるものである。「帯電している」の定義に適合するには、かなりの割合(少なくとも約25%)の個々の分子が生理学的pHで帯電している。極性または非極性の分類に必要な引き付けまたは反応の程度は任意のものであり、したがって、本発明により特異的に考案されたアミノ酸は、極性または非極性の何れかに特異的に分類された。特に挙げられていない殆どのアミノ酸は、既知の性質に基づいて分類される。

アミノ酸残基は、さらに、環式または非環式、芳香族または非芳香族、および小型または大型として分類される。環式または非環式、および芳香族または非芳香族という分類は、残基の側鎖置換基に関する独特な分類である。残基が、カルボキシルの炭素を含む合計4個以下の炭素原子を含有する場合には、小型と考えられる。小型の残基は、当然、常に非芳香族である。

天然のタンパク質アミノ酸については、上記の理論大系に従う下位分類は以下の通りである(図1も参照のこと)。

酸性: アスパラギン酸およびグルタミン酸;

塩基性/非環式: アルギニン、リシン;

塩基性/環式: ヒスチジン;

中性/極性/小型: グリシン、セリンおよびシステイン;

中性/極性/大型/非芳香族: トレオニン、アスパラギン、グルタミン;

中性/極性/大型/芳香族: チロシン;

中性/非極性/小型: アラニン;

中性/非極性/大型/非芳香族: バリン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン;

中性/非極性/大型/芳香族: フェニルアラニンおよびトリプトファン。

遺伝子にコードされたアミノ酸プロリンは、技術的には中性/非極性/大型/環式および非芳香族のグループに入る。しかし、ペプチド鎖の2次コンホメーションへのこのアミノ酸の既知の効果のために特殊なケースとなり、したがって、この特定の定義されたグループには入らない。

ある種のよく見られるアミノ酸は、遺伝子コードでコードされない。

このようなアミノ酸としては、例えば、 β -アラニン(β -ala)、または3-アミノプロピオン酸、4-アミノ酪酸などの他の ω -アミノ酸、 α -アミノイソ酪酸(Aib)、サルコシン(S

ar)、オルニシン(Orn)、シトルリン(Cit)、ホモアルギニン(Har)、t-ブチルアラニン(t-BuA)、t-ブチルグリシン(t-BuG)、N-メチルイソロイシン(N-Melle)、フェニルグリシン(Phg)、およびシクロヘキシルアラニン(Cha)、ノルロイシン(Nle)、システイン酸(Cys)並びにメチオニンスルホキシド(MSO)がある。これらもまた、適切に特定のカテゴリーに属する。

上記の定義に基づいて、

Sarおよび β -alaは中性/非極性/小型であり;

t-BuA、t-BuG、N-Melle、NleおよびChaは、中性/非極性/大型/非芳香族であり;

HarおよびOrnは塩基性/非環式であり;

Cysは酸性であり;

Cit、アセチルLys、およびMSOは、中性/極性/大型/非芳香族であり;そして、

Phgは、中性/非極性/大型/芳香族である。

図1も参照のこと。

種々の ω -アミノ酸は、サイズによって、中性/非極性/小型(β -ala、即ち、3-アミノプロピオン酸、4-アミノ酪酸)または大型(その他全ての ω -アミノ酸)に分類される。

遺伝子にコードされたアミノ酸に代わる他のアミノ酸置換物もまた、本発明の範囲のペプチド化合物に含まれ、この一般理論大系の範囲で分類され得る。

本発明のGLP-1アナログ化合物の記載に使用する命名は、

ペプチド中の各アミノ酸の左にアミノ基、右にカルボキシル基があると仮定する従来の命名法に従う。本発明の選択された特異的な実施態様を表示する式において、アミノおよびカルボキシル末端基は、多くの場合特に示していないが、他に明示していない限り、生理学的pH値において呈するであろう形態をとることは理解される。したがって、生理学的pHにおけるN末端 H^+ およびC末端 O^- は、必ずしも明示および図示されているわけではないが、特定の実施例または一般式中で存在すると理解される。

上記の説明は、中性pHでの末端の状態に関するものであるが、ペプチドの酸性付加塩または塩基性塩もまた本発明の範囲に含まれる。高いpHでは、C末端およびカルボキシルを含有する側鎖の塩基性塩が、毒性のない薬学的に許容可能な塩基から形成され得る。適切な逆のイオンとして、例えば Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{++} などがある。適切な薬学的に許容可能な毒性のない有機陽イオンもまた、逆のイオンとして使用できる。さらに、上記のように、ペプチドが、対応するアミドとして調製され得る。

N末端またはアミノ基含有側鎖に関する適切な酸性付加塩としては、塩酸、硫酸、もしくはリン酸などの無機酸から形成される塩、および、酢酸、クエン酸などの有機酸または他の薬学的に許容可能な毒性のない酸から形成される塩がある。

提示されるペプチドでは、コードされた各残基は、適切な

位置で、以下の従来の表に従って、アミノ酸の慣用名に対応する一文字表記によって表示される。

(以下余白)

| アミノ酸 | 一文字記号 |
|----------|-------|
| アラニン | A |
| アルギニン | R |
| アスパラギン | N |
| アスパラギン酸 | D |
| システイン | C |
| グルタミン | Q |
| グルタミン酸 | E |
| グリシン | G |
| ヒスチジン | H |
| イソロイシン | I |
| ロイシン | L |
| リシン | K |
| メチオニン | M |
| フェニルアラニン | F |
| プロリン | P |
| セリン | S |
| トレオニン | T |
| トリプトファン | W |
| チロシン | Y |
| バリン | V |

遺伝子的にコードされていないアミノ酸は、前述のように略記される。

本出願の特異的なペプチドは、上付き文字のダガー (†) によって他に明示しない限りは、光学異性体を有するL型の何れかのアミノ酸残基を意味するものとする。本発明のペプチドのアナログ中の残基は、通常、天然L光学異性体である。ただし、1個または2個の、好ましくは1個のアミノ酸が、天然のアミノ酸に代わって置換される特定の「同一アミノ酸のD型」の他に、D配置となり得る。

特異的なアナログの指定に使用する表記法では、改変された位置を、置換アミノ酸に対する上付き文字として示す。したがって、(H†)⁷-GLP-1 (7~37) は、表示されたGLP-1 (7~37) において、7位がD型のヒスチジンに置換された形態である。(S)²²(R)²³(R)²⁴(Q)²⁶-GLP-1 (7~37) は、7~37のGLPにおいて、22位でセリンに、23位および24位でアルギニンに、さらに26位でグルタミンに置換された形態である。

好ましい実施形態

A. 向上した刺激性を有するアナログ

向上したインスリン刺激活性を有するアナログに関して、本発明の特に好ましいアナログ組成物は、GLP-1の切断型に比べて、限られた数の改変または置換が行われているのみのものである。したがって、好ましいアナログは、発明の開示の如く上述した段落(a)~(e)の内の僅か1つまたは

2つの段落に記載の改変が行われているものである。

したがって、本発明の好ましいアナログとしては、(7~34)、(7~35)、(7~36)または(7~37)の形態のGLP-1において、26位および/もしくは34位のリシンを中性アミノ酸、アルギニンもしくはD型のリシンに、並びに/または26位のアルギニンを中性アミノ酸、リシンもしくはD型のアルギニンに置換した(段落(a))だけのものがある。特に好ましいものでは、26位および34位のリシンに代わって置換されるアミノ酸が、K†、G、S、A、L、I、Q、R、R†およびMからなる群より選択され、かつ36位のアルギニンに代わって置換されるアミノ酸が、K、K†、G、S、A、L、I、Q、MおよびR†からなる群より選択される。

31位のトリプトファンに代えて耐酸化性アミノ酸に置換することのみによって改変したアナログもまた好ましい(段落(b))。特に好ましい置換アミノ酸は、F、V、L、I、AおよびYからなる群より選択される。

段落(c)に記載の特異的な置換のうちの少なくとも1種類による改変のみを行ったアナログもまた好ましい。特に好ましいアナログでは、22位のGがSに、23位のQおよび24位のAがRに、かつ28位のKがQに全て置換されているか、または、16位のVがYに、かつ18位のSがKに置換されているか、あるいは、これらの置換に加えて21位のEがDに置換されている。

段落(d)に記載の改変のみを行ったアナログもまた好ましい。これらのアナログの内の特に好ましいものにおいては、8位のアラニンに代えて置換される小型の中性アミノ酸が、S、S†、G、C、C†、Ser、A†、β-alanineおよびAlbからなる群より選択され；並びに/または、9位のグルタミン酸に代えて置換される酸性もしくは中性アミノ酸が、E†、D、D†、Cys、T、T†、N、N†、Q、Q†、Cit、WSOおよびアセチル-Kからなる群より選択され；並びに/または、10位のグリシンに代えて置換される他の中性アミノ酸が、S、S†、Y、Y†、T、T†、N、N†、Q、Q†、Cit、WSO、アセチル-K、FおよびF†からなる群より選択され；並びに/または、15位のEがDに置換される。

7位のみが改変された(段落(e))アナログもまた好ましい。好ましい置換では、7位のヒスチジンに代えて置換されるアミノ酸が、H†、Y、Y†、F、F†、R、R†、Orn、Orn†、M、M†、N-ホルミル-H、N-ホルミル-H†、N-アセチル-H、N-アセチル-H†、N-イソプロピル-H、N-イソプロピル-H†、N-アセチル-K、N-アセチル-K†、PおよびP†からなる群より選択される。

以下の特異的な実施形態に加えて、上記の改変型のクラスの僅か2種類の組み合わせを有する実施形態もまた好ましい。

以下の特異的なアナログが好ましい。

(H†)⁷-GLP-1 (7~37)；

(Y)⁷-GLP-1 (7~37)；

(N-アセチル-H) ⁷-GLP-1 (7~37) ;
 (N-イソプロピル-H) ⁷-GLP-1 (7~37) ;
 (A†) ⁴-GLP-1 (7~37) ;
 (E†) ⁵-GLP-1 (7~37) ;
 (D) ³-GLP-1 (7~37) ;
 (D†) ³-GLP-1 (7~37) ;
 (F†) ¹⁰-GLP-1 (7~37) ;
 (S) ²²(R) ²³(R) ²⁴(Q) ²⁶-GLP-1 (7~37) ;
 および
 (S) ⁴(Q) ⁹(Y) ¹⁶(K) ¹⁸(D) ²¹-GLP-1 (7~37) 。

B. 向上した安定性を有するアナログ

向上した安定性を有するアナログの好ましい形態においてもまた、僅か1種類、または多くとも2種類のアミノ酸改変が行われている。

7位のヒスチジンに代えて置換される好ましいものとしては、D型の酸性もしくは中性アミノ酸またはD型のヒスチジンがある。Pf、D†、E†、N†、Q†、L†、V†、I†およびH†が好ましい。

7位のヒスチジン、またはこれと置換されたアミノ酸(DもしくはL)もまた、Nアルキル化(1-6C)またはNアシル化(1-6C)され得る。

アルキル基は、Cで示されたメンバーの、置換または枝分かれ鎖(環式を含む)のヒドロカルビル(hydrocarbyl)残基

である。アシル基は、式RCO-で示され、式中、Rは上に定義したように、アルキルである。好ましいアルキル基は、i-プロピル、α-プロピルおよびエチルであり、好ましいアシルは、アセチルおよびプロピオニルである。アルキル化もしくはアシル化され得る好ましい残基としては、DもしくはL型の、P、D、E、N、Q、V、L、I、KおよびHがある。

8位のアラニンに代えて置換される好ましいものとしては、D型のP、V、L、IおよびAがある。D型のD、E、N、Q、K、T、SおよびHもまた好ましい。

以下に寓託されるように、ある特定のアナログの中には向上したインスリン放出刺激活性と向上した安定性との両方を呈するものがあることは理解される。

製法

本発明のアナログは、ペプチド合成のための標準固相技術を用いて調製され得る。一般に知られているように、必要な長さのペプチドは、市販の器具および試薬を用いて調製され得る。その際には、製造業者の指示書に従って、妨害基の阻止、反応するアミノ酸の保護、反応しない残基のカッピング、脱保護、およびキャッピングが行われる。適切な器具は、例えば、Foster City, CaliforniaのApplied BioSystemsまたはSan Raphael, CaliforniaのBioscience Corporationから入手され得る。

好ましい方法では、標準自動固相合成プロトコルを用いて

ペプチドが合成され、その際には、適切に側鎖を保護されたt-ブトキシカルボニル-α-アミノ酸を使用する。完成したペプチドを、標準フッ化水素法を用いて、固相支持体から除去し、同時に側鎖の脱保護を行う。粗ペプチドを、さらに、半予備逆相-HPLC(semi-preparative)(Vydac C₁₈)によって、0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)中のアセトニトリル勾配を用いて精製する。ペプチドを真空乾燥させることによりアセトニトリルを除去し、そして、0.1%TFA水溶液から凍結乾燥させる。純度を分析RP-HPLCによって確認する。ペプチドを、凍結乾燥させて、水または0.01Mの酢酸中に重量1~2mg/mLの濃度で溶解させ得る。

上記の合成方法の使用は、コードされていないアミノ酸またはD型のアミノ酸がペプチド中にある場合に必要となる。しかし、遺伝子にコードされたペプチドに関しては、市販の発現システムで容易に合成されたDNA配列を使用する組換え技術を用いることもできる。

処方および投与

本発明のアナログはI型糖尿病の治療に有用である。アナログは、当該分野で一般に知られているように種々の処方で全身に投与され得る。ペプチド投与の特定の形態に適切な処方、例えば、Reginon's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvaniaの最新版に記載されている。一般的に、処方では、効果的な量のアナログまたは複数種類のアナログの混合物、および少なくとも1

種類の薬学的に許容可能な賦形剤が使用される。

種々の投与形態が、全身治療に効果的である。投与形態には、例えば、静脈注射、筋肉注射、皮下注射および腹腔内注射などの注射、適切な坐薬またはスプレーを用いる経腸または経皮投与、並びに、適切に処方される場合には、経口投与がある。注射のための適切な賦形剤としては、ハンス液およびリンガー液などの種々の生理学的緩衝剤がある。適切な経腸または経皮処方は、胆汁酸塩(bile salt)またはラザード(fusidates)などの浸透剤を含有する。典型的な経口処方は、活性成分の消化を阻害する保護剤を含有する。ビロリンおよびメチルセルロースなどの高分子マトリックスを用いる種々の経腸性処方もまた利用可能である。他の薬剤送達システムには、リポソームおよびマイクロエマルションがある。種々の処方が実施可能であり、選択されたペプチドのための適切な処方および投与経路の提供は、一般に実施者によって理解される。

本発明の化合物の典型的な投与量は、約1pg/kg~1mg/kg(体重)である。但し、この投与量は概算であり、アナログの有効性、循環半減期、被験体の個々の特徴などの多くの要因に左右される。各個体の糖尿病治療におけるインスリン投与の最適化は、十分に確立されており、類似の最適化プロトコルがここで使用される。

実施例

以下の実施例は、本発明を説明するためのものであり、限

定するものではない。

実施例 1

本発明のアナログにより向上したインスリン刺激

図 2 に示すように、天然の構造を改変する種々の置換基を有する本発明のアナログが調製された。これらのアナログの内の幾つかを上記のアデュル酸シクラーゼアッセイで試験した。その結果を表 1 に示す。

(以下余白)

表 1

| ペプチドコントロール | ED50 nM 2 回 の アッセイ | |
|--|-----------------------|---------|
| | 0.16 | 0.25 |
| GLP-1(7-37) | 0.16 | 0.20 |
| GLP-1(7-36) (amide) | | |
| PP 15 ペプチド | | |
| Glucagon | 80.0 | 140 |
| Secretin | 10.0 | - |
| GIP | 10.0 | 37.5 |
| GRF | 10.0 | - |
| エペチンコントロール | | |
| GLP-1(1-37) | >1000 | 2900 |
| GLP-1(2-37) | - | - |
| GLP-1(3-37) | 70 | 81 |
| GLP-1(4-37) | 130 | 200 |
| GLP-1(5-37) | 150 | 750-970 |
| 7107 | | |
| (H ⁺) ⁷ -GLP-1(7-37) | 1.1 | 2.2 |
| (Y) ⁷ -GLP-1(7-37) | 5.0 | 3.0 |
| (N-7セチル-E) ⁷ -GLP-1(7-37) | 15.5 | - |
| (N-イソ7セチル-E) ⁷ -GLP-1(7-37) | 15.5 | - |
| (K) ⁷ -GLP-1(7-37) | 350.0 | - |
| (A ⁺) ⁸ -GLP-1(7-37) | 0.40 | 0.55 |
| (E ⁺) ⁸ -GLP-1(7-37) | 55.0 | 74.0 |
| (D) ⁸ -GLP-1(7-37) | 0.17 | 0.28 |
| (D ⁺) ⁸ -GLP-1(7-37) | 0.90 | 0.90 |
| (T ⁺) ¹⁰ -GLP-1(7-37) | 12.0 | 23.0 |
| (S) ²² (R) ²³ (R) ²⁴ (Q) ²⁶ -GLP-1(7-37) | 0.94 | 1.8 |
| (S) ⁸ (Q) ⁹ (Y) ¹⁶ (K) ¹⁸ (D) ²¹ -GLP-1(7-37) | 0.31 | |

従って、本発明の様々なアナログが、インスリンに対する挙動を調べるアッセイにおいて、有用な範囲の有効性を示している。

実施例 2

GLP-1アナログの向上した安定性

A. 不活性化形質の証明

GLP-1(7-37)切断型のホルモンをラジオヨウ素化し、精製したペプチドを血漿とともにインキュベートし、上記のように、ラジオラベルシーケンシングによってアッセイした。0分後、15分後、および60分後に、サンプルのシーケンシングを行った。0分後では、サイクル13で、放射線の単一ピークが発見され、分解がないことが示された。15分後では、サイクル13で、放射線の量が減少し、サイクル11で増加した。インキュベーションの60分後、実質的にすべてのカウントが、サイクル11で現れた。

従って、単一のジペプチルアミノペプチダーゼ阻害が、GLP-1(7-37)ペプチドの分解に関与していると思われる。

上記の結果は、N末端特異的およびC末端特異的抗血清を使用するRIAによって測定されるような分解と一致している。上記のように血漿とともにインキュベートし、RIAでテストしたところ、回収したフラグメントがラジオラベルされたGLP-1(7-37)のカルボキシル末端特異的抗体への結合を阻害する、の能力は減少していなかった。しかし、1時間後には、アミノ末端特異的抗体への結合を阻害する能力は、ほとんど0まで

減少した。

B. ラジオラベルシーケンシングによりテストされたGLP-1(7-37)アナログ

3位にD-Aspまたは8位にD-Alaを含むGLP-1(7-37)アナログを使用して、分解分析のラジオラベルシーケンシングを行った。このアッセイの結果を図 3 に示す。図 3 A は、(D⁺)⁸-GLP-1(7-37)の結果を示し、図 3 B は、(A⁺)⁸-GLP-1(7-37)の結果を示す。これらの図に示されるように、(D⁺)⁸アナログは、GLP-1(7-37)と同様に分解する。一方、(A⁺)⁸アナログは、60分後には、ほとんど分解を示さなかった。

C. RIAによりテストされたアナログ

N末端特異的抗体は、アナログの分解を測定するのに使用され得る。但し、この抗体が、N末端に改変を含むこれらのアナログと交差反応する能力をもつ場合に限られる。図 4 は、7位、8位、および9位で改変されたアナログの結果を示す。(Y)⁷、(HT)⁷、および(A⁺)⁸は、高濃度ではあるが、交差反応が可能であり、(D⁺)⁸は可能でない。交差反応ペプチドを高濃度 (10-100 nM) で60分間、血漿とともにインキュベートし、N末端特異的抗体に対するRIAを使用するRIAでテストした。パラグラフ B の結果に一致して、(A⁺)⁸アナログは、60分後には分解せず、(HT)⁷アナログも分解しなかった。しかし、(Y)⁷アナログは分解した。

D. HPLCによる、アナログのプロテアーゼ耐性

GLP-1(7-37)と比較した場合の、様々なアナログの分解耐

性もまた、上記のように、EPLCによってテストした。血漿中でのインキュベーションを80分間行い、この後、分解は観察されなかった。すなわち分解は完了した。その結果を表2に示す。

(以下余白)

表 2

| アナログ | 分解阻性 |
|---|------|
| (BT) ⁷ GLP-1(7-37) | + |
| (H-アセチル-H) ⁷ GLP-1(7-37) | + |
| (H-インプロピル-H) ⁷ GLP-1(7-37) | + |
| (Y) ⁷ GLP-1(7-37) | - |
| (X) ⁷ GLP-1(7-37) | - |
| (H-アセチル-X) ⁷ GLP-1(7-37) | + |
| (S) ⁸ (Q) ⁹ (Y) ¹⁰ (X) ¹⁰ (D) ²¹ GLP-1(7-37) | - |
| (AT) ⁹ GLP-1(7-37) | + |
| (DT) ⁹ GLP-1(7-37) | - |
| (BT) ⁹ GLP-1(7-37) | - |
| (Q) ⁹ GLP-1(7-37) | - |

Figure 1

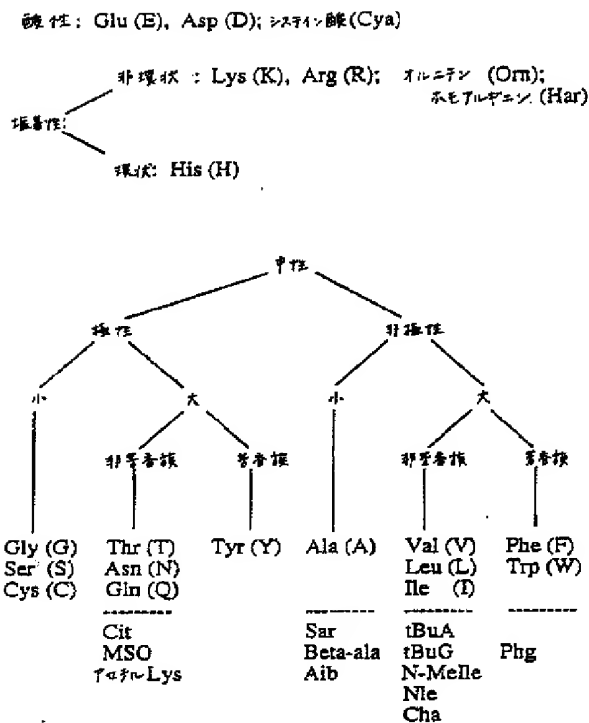


FIGURE 2

以下は、示されるように、GLP-1(7-37)の改変された部位である

| | |
|------------------------------|--|
| A-1 (H) ⁷ | A-11 (N) ⁷ |
| A-2 (Y) ⁷ | A-12 (H-ホルミル-H) ⁷ |
| A-3 (X) ⁷ | A-13 (H-ホルミル-H) ⁷ |
| A-4 (P) ⁷ | A-14 (H-アセチル-H) ⁷ |
| A-5 (Y) ⁷ | A-15 (H-アセチル-H) ⁷ |
| A-6 (R) ⁷ | A-16 (H-イソプロピル-H) ⁷ |
| A-7 (X) ⁷ | A-17 (H-イソプロピル-H) ⁷ |
| A-8 (Orn) ⁷ | A-18 (X) ⁷ |
| A-9 (Orn) ⁷ | A-19 (X) ⁷ |
| A-10 (H) ⁷ | A-20 (H-アセチル-X) ⁷ |
| A-21 (H-アセチル-X) ⁷ | A-21 (bmta-Ala) ⁸ |
| A-22 (P) ⁷ | A-22 (Ala) ⁸ |
| A-23 (P) ⁷ | A-23 (E) ⁹ |
| A-24 (A) ⁸ | A-24 (D) ⁹ |
| A-25 (Sar) ⁸ | A-25 (DT) ⁹ |
| A-26 (C) ⁸ | A-26 (Cys) ⁹ |
| A-27 (C) ⁸ | A-27 (T) ⁹ |
| A-28 (G) ⁸ | A-28 (T) ⁹ |
| A-29 (S) ⁸ | A-29 (N) ⁹ |
| A-30 (S) ⁸ | A-30 (N) ⁹ |
| A-41 (Q) ⁹ | A-51 (T) ¹⁰ |
| A-42 (Q) ⁹ | A-52 (N) ¹⁰ |
| A-43 (Cit) ⁹ | A-53 (N) ¹⁰ |
| A-44 (MSO) ⁹ | A-54 (C) ¹⁰ |
| A-45 (アセチル-X) ⁹ | A-55 (Q) ¹⁰ |
| A-46 (S) ¹⁰ | A-56 (Cit) ¹⁰ |
| A-47 (S) ¹⁰ | A-57 (MSO) ¹⁰ |
| A-48 (Y) ¹⁰ | A-58 (アセチル-X) ¹⁰ |
| A-49 (Y) ¹⁰ | A-59 (P) ¹⁰ |
| A-50 (T) ¹⁰ | A-60 (S) ²² (R) ²³ (R) ²⁴ (Q) ²⁶ |

FIGURE 2 続2

| | |
|--|-------------------------|
| A-61 (S) ⁸ (Q) ⁹ (Y) ¹⁶ (X) ¹⁶ (D) ²¹ | A-71 (A) ²⁵ |
| A-62 (T) ¹⁶ (K) ¹⁸ | A-72 (Q) ²⁶ |
| A-63 (Y) ¹⁶ | A-73 (K) ²⁶ |
| | A-74 (G) ²⁶ |
| A-65 (E) ¹⁵ | A-75 (S) ²⁶ |
| A-66 (K) ¹⁸ | A-76 (A) ²⁶ |
| A-67 (D) ²¹ | A-77 (L) ²⁶ |
| A-68 (S) ²² | A-78 (I) ²⁶ |
| A-69 (R) ²³ | A-79 (R) ²⁶ |
| A-70 (R) ²⁴ | A-80 (H) ²⁶ |
| A-81 (K) ²⁴ | A-91 (L) ³¹ |
| A-82 (G) ²⁴ | A-92 (I) ³¹ |
| A-83 (S) ²⁴ | A-93 (A) ³¹ |
| A-84 (A) ²⁴ | A-94 (Y) ³¹ |
| A-85 (L) ²⁴ | A-95 (R) ³⁴ |
| A-86 (I) ²⁴ | A-96 (Q) ³⁶ |
| A-87 (Q) ²⁴ | A-97 (K) ³⁶ |
| A-88 (H) ²⁴ | A-98 (R) ³⁶ |
| A-89 (F) ³¹ | A-99 (G) ³⁶ |
| A-90 (V) ³¹ | A-100 (L) ³⁶ |
| | A-101 (I) ³⁶ |
| | A-102 (Q) ³⁶ |
| | A-103 (M) ³⁶ |
| | A-104 (R) ³⁶ |
| | A-105 (S) ³⁶ |
| | A-106 (A) ³⁶ |

FIGURE 3A

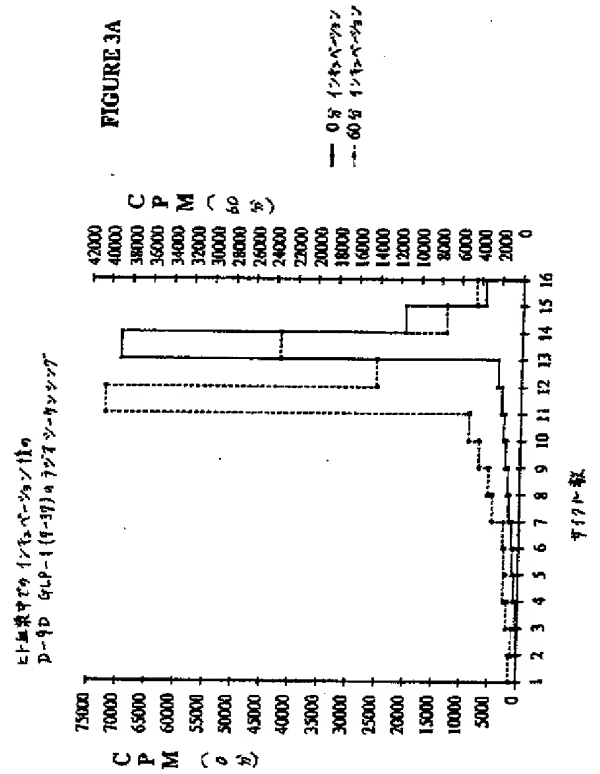
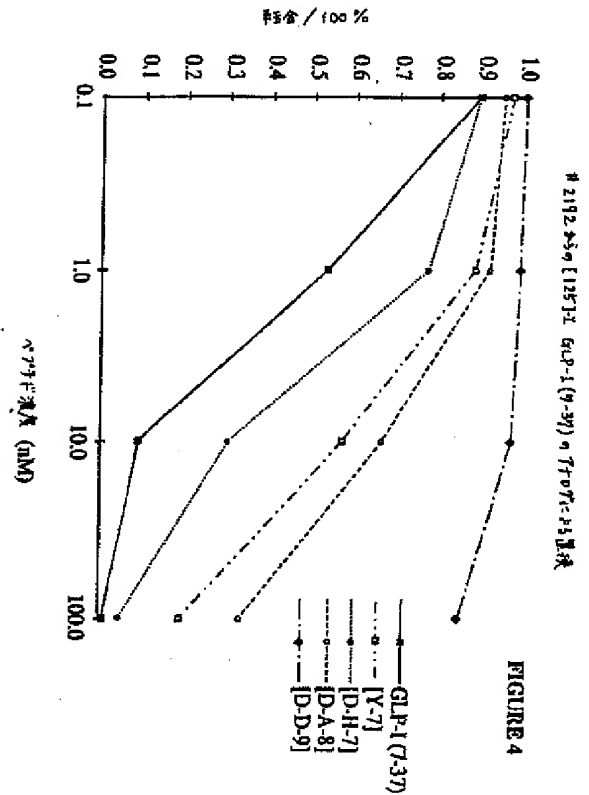
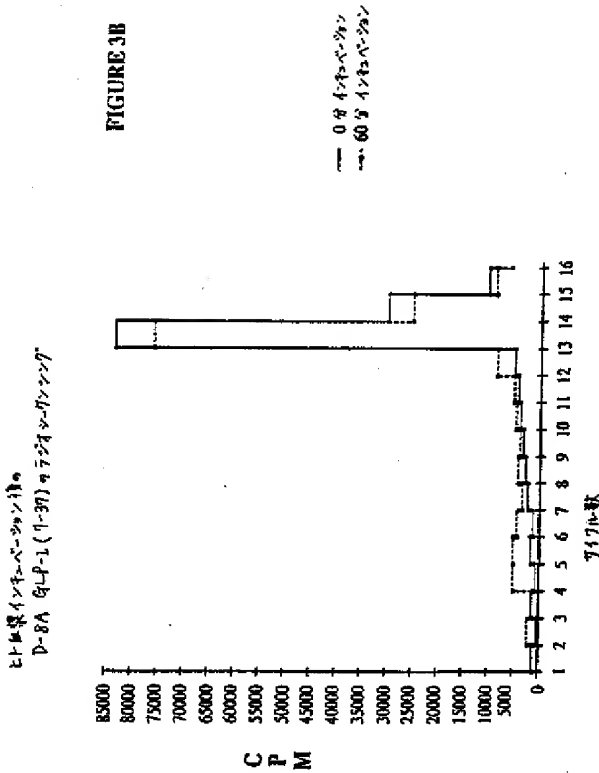


FIGURE 3B



要約書

本発明は、II型糖尿病の治療に対して改良された特徴を有する、活性GLP-1ペプチド、7-34、7-35、7-36および7-37の有効なアナログを提供する。これらのアナログは、7-10位でアミノ酸が置換されており、および／またはC末端が切断され、および／または基本のペプチド中に様々な他のアミノ酸置換を含む。アナログは、グルカゴンと比較して、インシュリン分泌を刺激する能力が向上し、GLP-1(7-37)と比較してプラズマ中での安定性が向上され得るか、あるいはその両方である。このような特性は、治療薬としてのアナログの能力を向上させる。1および8位にD形アミノ酸置換、および／または7位にNアルキル化またはNアンリアル化アミノ酸を有するアナログは、インビトロにおいて、特に分解阻害性である。

[illegible]

| | |
|---|--|
| FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET | International Application No. PCT/US91/003500 |
| | |
| <input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNREACHABLE | |
| This international search report (1) has been prepared in view of certain claims under Article 17(2) of the following reasons: | |
| <input type="checkbox"/> Claim numbers _____, because they (1) do not contain matter required to be searched by this Authority namely: | |
| <input type="checkbox"/> Claim numbers _____, because they claim to meet the international patentable but do not contain the prescribed requirements in order to have the successful international search can be carried out. (Specify) | |
| <input type="checkbox"/> Claim numbers _____, because they are dependent claims not drafted in conformity with the standard and thus unsearchable of PCT Rule 26.2. | |
| <input type="checkbox"/> OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING | |
| The international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows: | |
| See Attachment | |
| <input type="checkbox"/> As an exposed additional search has been timely made by the applicant, the international search cannot be searched on a searchable basis of the international application. | |
| <input type="checkbox"/> An only some of the required additional search has been timely made by the applicant, the international search report is not yet complete. | |
| <input type="checkbox"/> The international search has been timely made by the applicant. Consequently, the international search report is considered to be complete for the purposes of the international search. (Specify the claim numbers) | |
| 1-7 and 13 (Telephone Practice) | |
| <input type="checkbox"/> As an international search has been timely made by the applicant, the international Searching Authority is not required to search the international application. | |
| <input type="checkbox"/> The applicant has not yet made any request for a search. | |
| <input type="checkbox"/> The applicant has not yet made any request for a search. | |

Attachment to PCT/ISA/210

VI. Observations Where Unity of Invention is Lacking

F. Claims 1-7 and 13 are drawn to the peptide which are more patentable than glucagon in stimulation function, release from beta cells classified in class 520, subclass 301.

IX. Claims 8-11 and 14 are drawn to the peptide with enhanced resistance to degradation classified in class 520, subclass 302.

XII. Claim 12 is drawn to the pharmaceutical composition classified in class 514, subclass 12.

第1頁の続き

②発明者 ハベナー, ジョエル エフ.
 ③発明者 マロリー, ジョアンヌ ビー.
 ④発明者 モジュゾフ, スベトラーナ
 ⑤出願人 ハベナー, ジョエル エフ.
 ⑥出願人 マロリー, ジョアンヌ ビー.
 ⑦出願人 モジュゾフ, スベトラーナ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02161 ニュートン ハイラ
 ンズ, プリマス ロード 217
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94086 サニーベイル, エイビ
 ーテュー. 9 アカレーンズ 243
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021 ニューヨーク, イースト
 シツクスティサード ストリート 504
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02181 ニュートン ハイラ
 ンズ, プリマス ロード 217
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94086 サニーベイル, エイビ
 ーテュー. 9 アカレーンズ 243
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021 ニューヨーク, イースト
 シツクスティサード ストリート 504